

Aus dem medizinischen Zentrum für Hautkrankheiten der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. R. Happle
Abteilung für Andrologie, Leiter: Prof. Dr. W. Krause

Der Nachweis der Bindung von Spermatozoen- Autoantikörpern an Spermatozoen mittels indirekter Immunfluoreszenz

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ludger Klepper

aus Aachen

Marburg 2000

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizi
der Philipps-Universität Marburg am 24.1.2002
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Arnold
Referent: Prof. Dr. Krause
Correferent: Prof. Dr. Gemsa

Meinen Eltern
gewidmet in Liebe und Dankbarkeit

1 EINLEITUNG	5
1.1 MÄNNLICHE INFERTILITÄT UND UNERFÜLLTER KINDERWUNSCH	5
1.1.1 <i>Definition</i>	5
1.1.2 <i>Andrologische Labordiagnostik</i>	6
1.2 MORPHOLOGIE UND FUNKTION DER SPERMATOZOEN	8
1.3 SPERMATOZOEN-IMMUNOLOGIE	10
1.3.1 <i>Spermatozoen-Antigenität</i>	10
1.3.2 <i>Spermatozoen-Autoantikörper (SpAk)</i>	14
1.4 FRAGESTELLUNG	16
2 MATERIAL UND METHODIK	17
2.1 ARBEITSPRINZIP (ZUSAMMENFASSUNG)	17
2.2 IMMUNFLUORESCENZ	17
2.2.1 <i>Prinzip</i>	17
2.2.2 <i>Fluorochrome</i>	18
2.3 VERWENDETE PROBEN UND IHRE UNTERSUCHUNG	19
2.3.1 <i>Spender</i>	19
2.3.3 <i>Ejakulatuntersuchung</i>	20
2.3.4 <i>MAR-Test</i>	20
2.4 AUFBEREITUNG UND INKUBATION DER PROBEN	21
2.4.1 <i>Waschen und Fixierung</i>	21
2.4.3 <i>Kontrollen</i>	22
2.5 AUSWERTUNG	23
3. ERGEBNISSE	24
3.1 BINDUNGSVERHALTEN DER SPERMATOZOEN-AUTOANTIKÖRPER (SPAK)	24
3.2 BINDUNGSREGIONEN UND EJAKULATPARAMETER	28
3.2.1 <i>Assoziation von Spermatozoen-Autoantikörpern (SpAk) an der Akrosomregion und veränderter Akrosin-Aktivität</i>	28
3.2.2 <i>Assoziation von Spermatozoen-Autoantikörpern (SpAk) an Spermatozoen-Mittelstück und -Schwanz und herabgesetzter Vitalität</i>	29
3.2.3 <i>Assoziation von Spermatozoen-Autoantikörpern (SpAk) an Spermatozoen-Mittelstück und -Schwanz und herabgesetzter Motilität</i>	30
4. DISKUSSION	32
THERAPIEMÖGLICHKEITEN DER SPAK-INDUZIERTEN INFERTILITÄT	37
5. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	41

ANHANG	44
ABBILDUNGSVERZEICHNIS:	45
LITERATURVERZEICHNIS:	45

ABKÜRZUNGEN

AZA	Anti-Zona-pellucida-Antikörper	IUI	Intrauterine Insemination
APA	Anti-Phospholipid-Antikörper	IVF	In vitro Fertilisation
BSA	Bovines Serum-Albumin	MAR	Mixed Antiglobulin Reaction
CASA	Computer-assitierte Samenanalyse	MoAk	Monoklonale Antikörper
Cy	Cyanin-Derivat	OAT	Oligo-Asthen-Teratozoospermie
FITC	Fluorescein Isothiocyanat	PBS	Phosphated buffer saline
HOS-		SpAk	Spermatozoenautoantikörper
Test	Hypoosmolarer Schwelltest)	Spz	Spermatozoen
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion	TÜS	Tübinger Spermatozoen-Antikörper

1 Einleitung

1.1 Männliche Infertilität und unerfüllter Kinderwunsch

1.1.1 Definition

Männliche Infertilität bedeutet definitionsgemäß die Unfähigkeit, innerhalb von 12 Monaten trotz regelmäßigen sexuellen Verkehrs mit einer gesunden Partnerin eine Konzeption zu erreichen [Schmidt und Münster, 1995]. Die Subfertilität eines Partners kann weitgehend durch die normale Fertilität des anderen kompensiert werden. Diese Paare stellen sich folglich nicht in einer Infertilitätssprechstunde vor. Bei Patienten, die sich in der andrologischen Ambulanz vorstellen, ist die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Störung der reproduktiven Funktion also auch beim weiblichen Partner erhöht. Dies gilt natürlich auch umgekehrt und muß zur Folge haben, daß stets beide Partner untersucht werden [Ochsendorf und Beschmann, 1996].

Jüngere Schätzungen gehen für Deutschland von einer Prävalenz der (primären und sekundären) Infertilität um 15% der Paare im reproduktionsfähigen Alter aus. Da bei der etwa Hälfte der Paare mit ungewollter Kinderlosigkeit auch Ursachen auf Seiten des Mannes gefunden werden, müssen ca. 15% aller Männer im Laufe ihres Lebens mit dem Problem einer Störung ihrer Zeugungsfähigkeit konfrontiert werden [Nieschlag und Behre, 1996].

1.1.2 Andrologische Labordiagnostik

Eine wichtige Untersuchung zur Diagnostik der männlichen Infertilität ist die des Ejakulates. Es setzt sich aus den Spermatozoen und Rundzellen und dem Seminalplasma, das aus Nebenhoden und akzessorischen Geschlechtsdrüsen entstammt, zusammen. Das Seminalplasma stammt zu etwa 60% aus den Vesiculae seminales und etwa 30% aus der Prostata, nur etwa 5% werden in Hoden und Nebenhoden gebildet, der Rest stammt aus den Cowperschen Drüsen.

Vor der mikroskopischen Untersuchung wird das gewonnene Ejakulat zunächst grob-orientierend nach Menge, Konsistenz, Farbe, Geruch, PH-Wert und Verflüssigungszeit untersucht.

Zu den Möglichkeiten zur Bestimmung der Spermatozoendichte zählen:

- Zählung, z.B. in der Neubauer-Zählkammer.
- Elektronische Zählgeräte
- Bestimmung der DNA der Einzelzellen mittels Flowzytometer
- Computer-assoziierte Samenanalyse (CASA)

Auch zur Bestimmung der Spermatozoen-Motilität (Beweglichkeit) stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung:

- Schätzung
- Auszählung von Gesichtsfeldern
- Laserspektroskopie (Prinzip beruhend auf Doppler-Effekt durch motile Spermatozoen)
- Multiple Exposure-Photography (MEP), (stroboskopische Bildanalyse)
- CASA

Die Ergebnisse der Motilitäts-Schätzung lassen sich nach Vorgaben der WHO vier Kategorien zuordnen:

- WHOa: schnelle progressive Beweglichkeit (d.h. $\geq 25 \mu\text{m/sec}$ bei 37°C und $\geq 20 \mu\text{m/sec}$ bei 20°C);
- WHOb: langsame oder träge progressive Beweglichkeit;
- WHOc: nicht-progressive Beweglichkeit ($< 5 \mu\text{m/sec}$ bei 37°C);
- WHOd: Immotilität.

In normalen Ejakulaten sollen 50% der Spermatozoen oder mehr eine Motilität der Kategorien a und b oder 25% oder mehr eine Beweglichkeit der Kategorie a aufweisen [Schill und Köhn, 1998].

Die Beurteilung der Spermatozoen-Morphologie beruht v.a. auf Färbeverfahren. Auch hier wird die CASA eingesetzt. Aufgrund der hohen Variabilität der subjektiven Morphologieschätzung ist die CASA in der Reproduzierbarkeit überlegen. Bis heute kann allerdings ein CASA-System nicht den menschlichen Beobachter ersetzen, sondern ihn nur unterstützen [Davis und Katz, 1992].

Selten sind einzelne Parameter singulär verändert; meist liegt im Rahmen des OAT-Syndroms (Oligo-Astheno-Teratozoospermie-Syndrom) eine Kombination aus Oligozoospermie (Samenzelldichte $< 20 \text{ Mio./ml}$), Asthenozoospermie (Anteil beweglicher Samenzellen $< 50\%$) und Teratozoospermie (Anteil normal geformter Samenzellen $< 30\%$) vor.

Laut Rumke et al. (1959) liegen bei etwa einem Drittel der Patienten mit Oligozoospermie gegen Spermatozoen gerichtete Antikörper vor.

Die Messung der Akrosin-Aktivität ist u.a. zur Sicherung der Diagnose Globozoospermie erforderlich, bestätigt aber auch bei anderen Malformationen

(z.B. Stummelkopfspermatozoen) den Verlust von Penetrationsenzymen. Bei Polyzoospermie kann die Akrosin-Aktivität erniedrigt sein [Schill und Köhn, 1998]. Die Akrosin-Aktivität kann entweder enzymatisch gemessen oder mittels Gelatinolyse semiquantitativ bestimmt werden. Normalwerte (Enzymassay): 0,6-2,0 mU/10⁶ Spz..

Die Membranstabilität wird mit dem Eosintest oder dem Hypoosmolaren Schwelltest (HOS-Test) untersucht, die Akrosomreaktion wird in vitro gemessen. Keinem der folgenden Parameter des Seminalplasmas konnte bisher ein eindeutiger Einfluß auf die Fertilisierungskapazität der Samenzellen zugeschrieben werden [Krause und Weidner 1998, Kap. 2.5.6]:

Prostataphosphatase und Prostata-spezifisches Antigen (PSA) werden als Maß für die sekretorische Aktivität der Prostata verwendet, die Fructosekonzentration als Maß für die Bläschendrüsensfunktion und α -Glucosidase für Verschlüsse peripher des Nebenhodens. Proteine, Immunglobuline und Granulozyten-Elastase sind Entzündungsmarker.

1.2 Morphologie und Funktion der Spermatozoen

Die Spermatozoen gliedern sich in zwei morphologisch und funktionell unterscheidbare Regionen: das der Fortbewegung dienende Flagellum (Länge ca. 50-60 μm) und den das hochkondensierte Erbmaterial enthaltende Kopf (ca. 5,5 μm lang und 2,5-3 μm breit). Der Spermatozoen-Kopf besteht aus Kern, Kernmembran, perinukleärem Raum, subakrosomalem Spalt und dem Akrosom. Das Akrosom im vorderen Bereich des Kopfsegmentes - mit einer äußeren und einer inneren akrosomalen Membran - enthält Enzyme, die für die Penetration von Cumulus oophorus und Zona pellucida zuständig sind: v.a. das proteolytische

Akrosin, dessen Vorstufen sowie Hyaluronidasen [Barros et al., 1996]. Außerdem

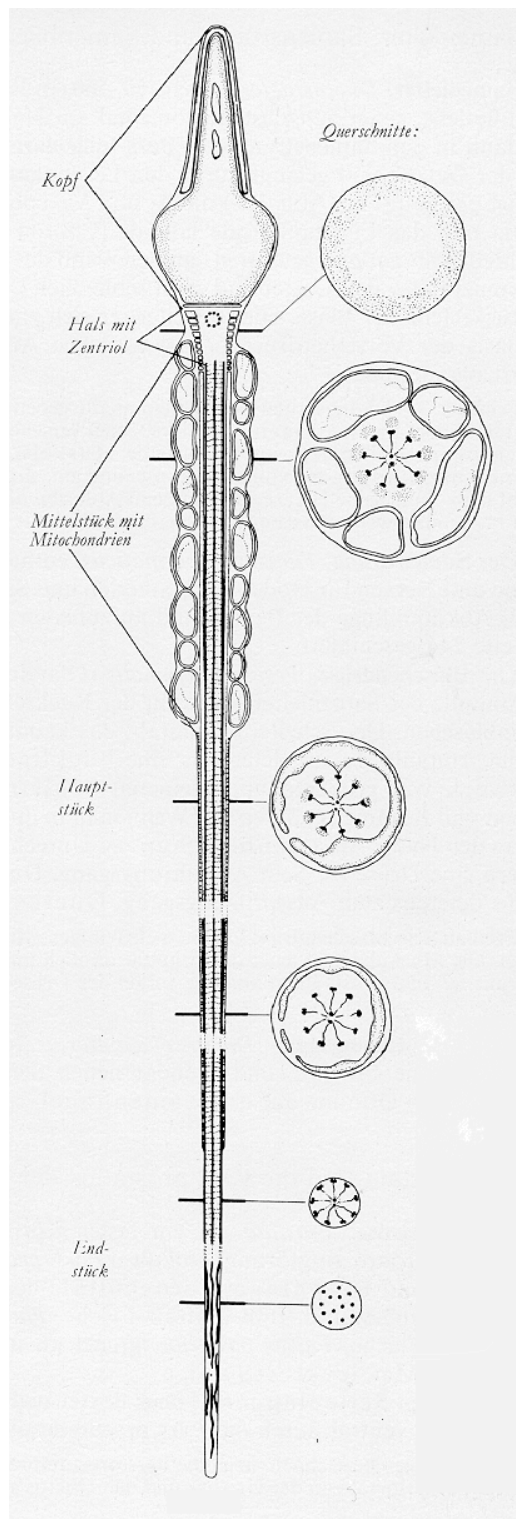


Abb. 1.: Elektronische Darstellung einer Samenzelle nach Ånberg, 1956

finden sich hier Rezeptoren für die Zona- und Oolemmabindung [Miller et al., 1992].

Die als Akrosomreaktion bezeichnete Freilegung der inneren akrosomalen Membran mit Freisetzung der akrosomalen Inhaltsstoffe bedarf der vorhergehenden Kapazitation. Dieser Prozeß wird vermutlich durch ein Zusammenspiel verschiedener Enzyme, Hormone und anderer Stoffe des weiblichen Genitalsekretes eingeleitet. Keine Substanz der weiblichen Genitalsekrete scheint alleine essentiell für die Kapazitation zu sein [Yanagimachi, 1988]. Die Kapazitation führt zu einer Veränderung der molekularen Zusammensetzung, der Struktur und der Eigenschaften der Spermatozoen-Membran. Außerdem entsteht ein hyperaktives, aber weniger progressives Bewegungsmuster der Spermatozoen. Diese Veränderungen scheinen Voraussetzungen für die Penetration von Cumulus oophorus und Zona pellucida zu sein. Die innere akrosomale Membran liegt der Kernmembran auf. Der Kern besteht aus DNA (haploider Chromosomensatz; extrem verdichtetes osmiophiles Chromatin) und aus

Proteinen.

Beim Kopf unterscheidet man zwischen dem zentral gelegenen Äquatoralsegment und dem postakrosomalen Teil.

Das Flagellum läßt sich in Halsstück, Mittelstück, Hauptstück und Endstück unterteilen. Das Mittelstück ist ca. 4-6 µm lang und ca. 1 µm dick. Es enthält die für die Energieversorgung wichtigen Mitochondrien. Das Hauptstück ist ca. 40-50 µm lang und zusätzlich von einer „fibrösen Hülle“ umgeben. Mit Ausnahme des Endstückes wird das Flagellum vom Axonem durchzogen, welches die „9+2-Struktur“ der Mikrotubuli aufweist.

1.3 Spermatozoen-Immunologie

1.3.1 Spermatozoen-Antigenität

Die Immunogenität von Spermatozoen in homologen Systemen wurde experimentell bereits zu Anfang des letzten Jahrhunderts demonstriert [Metallnikoff, 1900], aber erst 54 Jahre später konnten Autoantikörper nachgewiesen werden (s. Kap.1.3.2). Spermatozoen-Antigene unterscheiden sich hinsichtlich Genese und Lokalisation: Sie sind sowohl im Seminalplasma als auch in und auf Spermatozoen nachweisbar. Zum einen finden sich integrale, während der Spermatogenese in der Spermatozoen-Membran selbst entstandene Antigene. Zum anderen finden sich Antigene, die sich von außen an die Oberfläche anlagern, sog. „Sperm-coating“-Antigene [Alexander und Anderson, 1987]. Wie aus Untersuchungen mit spermatozoenspezifischen monoklonalen Antikörpern hervorgeht, ergibt sich die Antigenität der Spermatozoen in ihrer Gesamtheit einerseits aus charakteristischen, genetisch determinierten und evolutionär konservierten Antigenen und andererseits aus der Dynamik des Antigenwechsels während der Spermatozoenreifung [u.a. Metallnikoff, 1979; Hargreave, 1994].

Nur einige dieser potentiellen Antigene wirken beim Menschen als Immunogene. Tatsächlich hat ein bestimmtes Glycoprotein des Seminalplasmas in seltenen

Fällen bei Frauen IgE-Antikörper induziert und so bei sexuellem Verkehr eine lokale oder generalisierte anaphylaktische Reaktion ausgelöst [Halpern et al., 1967].

1974 wurden verschiedene Hämocyanin-gekoppelte Hasen-Antiseren gegen Schweine-Spermatozoen beschrieben, die jeweils nur an in bestimmten Regionen (wie z.B. Akrosom oder Mittelstück) gelegene membranständige Antigene banden [Köhler & Perkins, 1974]. In den nachfolgenden Jahren wurden in einigen Studien unter Verwendung von Humanseren mit antispermalen Antikörpern viele membranständige Spermatozoen-Antigene differenziert (s. Tab.1). Hierbei ist die Technik der indirekten Immunpräzipitation auf Seren mit hohen Antikörper-Titern angewiesen, während das Immunoblotting eine deutlich höhere Sensitivität zeigt [u.a. Hargreave, 1994].

Autoren	Technik	identifizierte Antigene
Czuppon et al., 1981	Radio-Immuno-Assay und Absorption	Ein Antigen (35 kDa) konnte agglutinierende und immobilisierende Antikörper binden
Hjort et al., 1982; Poulsen, 1983	Indirekte Immun-Präzipitation	Drei verschiedene Antigene, 5 Polypeptide: 21, 32, 41, 77 und 120 kDa
Lee et al., 1983	Immunoblot	Verschiedene Antigene, vorherrschend 90 kDa
Lehmann et al., 1985	Immunoblot	15 verschiedene Polypeptide, 14 kDa
Naaby-Hansen und Bjerrum, 1985	Immunoblot	25 verschiedene Polypeptide: 32, 41, 64, 78 und 120 kDa
Saji et al., 1988	Indirekte Immun-Präzipitation	Zwei Antigene, 15 kDa
Snow und Ball, 1992	Immunoblot	7 verschiedene Polypeptide: 35, 40, 45, 57, 66, 88 und 90 kDa; an Plasmamembran, innerer akrosomaler Membran und Flagellum
De Beer et al., 1993	Immunoblot	Antigene aller Gewichtsklassen vorhanden; reaktive Banden v.a. bei 32 und 79 kDa; bei Antikörper-positiven Seren Banden v.a. bei 32 kPa
Auer et al., 1997	Immunoblot	18 verschiedene Proteine zwischen 18 und 110 kDa; die meisten Antikörper reagieren mit den membranständigen Antigenen von 18-20, 36-37 und 20/18; bei „Cell-surface-Antigenen“ diffuse Verteilung der Antikörper

Tab.1: Mittels humaner Seren mit Spermatozoen-Antikörpern identifizierte Spermatozoen-Antigene

Im Gegensatz zu den konventionellen Seren, die meist Antikörper gegen mehrere Antigene enthalten, bieten monoklonale Antikörper (MoAk) eine genauere Möglichkeit zur Identifizierung von Spermatozoen-Antigenen [Köhler und Milstein, 1976]. Gegen humane Spermatozoen-Antigene gerichtete MoAk wurden erstmalig von Shigeta et al. (1980) vorgestellt. Hirsch stellte 1989 erstmalig 15 verschiedene, gegen humane Spermatozoen-Antigene gerichtete monoklonale „Tübinger Spermatozoen-Antikörper (TÜS)“ vor, die jeweils ein regional spezifisches Bindungsverhalten aufwiesen. Eine Korrelation der Reaktivität der Akrosom- und Schwanz-spezifischen TÜS mit den entsprechenden Parametern des Ejakulatbefundes wurde nicht festgestellt. Schwarzingger et al. (1996) konnten mit Hilfe der Flowzytometrie nachweisen, daß die monoklonalen TÜS-Antikörper 1

(zu 30-35%), 19 (zu 30%) und 20 (zu 60%) an akrosomale Antigene binden; an Schwanzstrukturen banden TÛS-2 (zu 20-25%), TÛS-10 und TÛS-17. Allerdings reagieren nur einige der vielen hergestellten MoAk mit den membranständigen Antigenen [Anderson et al., 1987; Menge et al., 1987].

Viele Antigene finden sich innerhalb von bestimmten Domänen an der Plasmamembran. Zwischen der Lokalisation dieser Domänen und bestimmten spezialisierten Funktionen des Spermatozons werden Zusammenhänge vermutet. Nur ein Teil der vielen Oberflächen-Antigene binden Antikörper mit Einfluß auf die Fertilität. Diese Antigene erscheinen auf der gesamten Oberfläche des Spermatozons, sind aber wahrscheinlich in bestimmten Regionen stärker konzentriert; der agglutinierende Effekt soll von den Eigenheiten der jeweiligen Antikörper abhängen [Kay und Boettcher, 1985].

Während der Reifung im Nebenhoden werden die entsprechenden Antigen-Muster mehrfach in Organisation und Zusammensetzung verändert [Milette, 1979]. Einige bereits vorhandene Oberflächenmoleküle verhindern sterisch, daß sich weitere Antigene an die Plasmamembran anlagern. In anderen Domänen kann es hingegen zur Anlagerung von zusätzlichen sezernierten Antigenen kommen. Diese dienen wahrscheinlich der Maskierung der eigentlichen Spermatozoen-Antigene und bieten so einen gewissen immunologischen Schutz [Jones, 1980]. Während der Kapazitation und der akrosomalen Reaktion im weiblichen Genitaltrakt erscheinen zusätzliche Antigene auf der Spermatozoen-Oberfläche [Alexander, 1987].

Die sehr restriktive Blut-Hoden-Schranke, insbesondere die „tight junctions“ der Sertoli-Zellen, bewirkt normalerweise einen vollständig vom Blutkreislauf isolierten Ablauf der Spermatogenese. Gelangt jedoch etwa nach einer Verletzung der Blut-Hoden-Schranke antigenes Material in den Blutkreislauf, kann dieses unter Umständen die Bildung von Autoantikörpern induzieren [Cooper und Yeung, 1990]. Zudem scheint der Nebenhoden auch noch selbst eine immunsuppressive Aktivität zu entfalten: Makrophagen, die dem Immunsystem Spermatozoen-

Autoantigene präsentieren können, werden nur gelegentlich im Epididymidisepithel gefunden, sind jedoch reichlich im Interstitium vorhanden.

Homologe Antigene induzieren im Gegensatz zu den oben erwähnten autologen Antigenen eine Antikörperproduktion bei anderen Individuen derselben Spezies (der Sexualpartnerin). Hier sind vor allem Antigene des AB0-Systems, des NMS-Systems und - in geringerem Umfang - des HLA- und des HY-Systems zu nennen, die auch auf Spermatozoen lokalisiert sind. Die gegen Oberflächenantigene der Spermatozoen gerichteten Antikörper können zu einer immunologischen Infertilität der Frau führen [Henkel, 1998].

Nach den Untersuchungen von Schumacher (1988, 1989) ist das Vorkommen von Spermatozoen-Antikörpern in den Sekreten von Zervix und Corpus uteri bei sterilen Frauen und von Spermatozoen-Autoantikörpern in den Ejakulaten der Ehemänner jeweils nicht mit dem Nachweis im Serum korreliert.

1.3.2 Spermatozoen-Autoantikörper (SpAk)

Rumke und Wilson gelang erstmalig 1954 der Nachweis von SpAk im Serum zweier infertiler Männer. Heute werden diese mittels Immunobead- oder MAR-Test nachgewiesen. Bald wurde klar, daß SpAk die Fertilität beeinflussen können, wobei Konzentrationen und Immunglobulin-Klassen eine wichtige Rolle spielen.

14 verschiedene Oberflächen-Antigene gegen SpAk wurden an Spermatozoen nachgewiesen [Bohring, 1999]. Normalerweise wird der Antigen-Kontakt durch die engen Kontaktzonen der Sertoli-Zellen und durch die Epithelien des Nebenhodens verhindert. Bei Verletzungen dieser Kontaktzonen (z.B. nach Genitaltraktinfektionen, Hodentraumen, Gefäßaplasien oder Vasektomien) können aber SpAk entstehen, die man in Blut und/oder Seminalplasma nachweisen kann [Jarow, 1994]. Wird bei Ratten ein präpubertär beschädigtes Vas deferens

frühzeitig wiederhergestellt, ist die nachpubertär gemessene Konzentration an SpAk deutlich geringer [Flickinger et al., 2000].

Bei Abfall der Gonadotropin-Konzentration im Serum und bei Absetzen einer Testosteron-Therapie kann die SpAk-Konzentration ansteigen [Verajankorva, 1999].

In vielen Fällen ist dem Nachweis von SpAk keine Ätiologie zuzuordnen. SpAk werden bei 5-10% der nichtvasektomierten infertilen und bei 50-80% der vasektomierten Männer gefunden [Handelsmann, 1996].

Einige Arbeiten sprechen nur den im Ejakulat vorliegenden, spermatozoen-gebundenen IgA hinsichtlich einer immunologisch bedingten Infertilität eine klinische Relevanz zu [Witkin et al., 1981; Bronson et al., 1984; Marshburn und Kutteh, 1994]. Dies gilt auch für die Fertilitätsprognose nach Vasostomie [Meinertz et al., 1990]. Über eine Interaktion der an die Zelloberfläche der Spermatozoen gebundenen IgA mit den Glykoproteinmizellen des Zervikalsekrets wird die Migration der Spermatozoen durch das Zervikalsekret unterbunden (im Mukustest nachweisbar) [Kremer und Jager, 1992]; nicht so jedoch bei den IgG-Antikörpern.

Eine C'-vermittelte Spermatozoen-Immobilisierung und eine Toxizität gegen Spermatozoen sprachen Price und Boettcher 1979 hingegen gebundenen IgG (und IgM) zu.

Schließlich wurden mit Einführung der In-vitro-Fertilisation sowohl IgG- als auch IgA - Antikörpern eine Blockierung der Spermatozoen-Eizellen-Interaktion nachgewiesen, wobei der Einfluß der IgG deutlicher war [Mardesic, 2000].

Wilson und Fjällbrant wiesen 1965 nach, daß Antikörper-gebundene Spermatozoen Autoagglutinate bilden, ohne aber zwischen den Immunglobulin-Klassen zu differenzieren. Maßgeblich sind (nach Kremer und Jager, 1992) die gegen die Antigene des Spermatozoen-Kopfes gerichteten SpAk.

Barratt et al. (1989) konnten SpAk einen signifikanten Einfluß auf die Motilität von Spermatozoen nachweisen; Lansford et. al. (1990) berichteten von einer durch Calcium-Ionen ausgelösten vorzeitigen Akrosom-Reaktion bei Anwesenheit von SpAk.

London et al. (1983) wiesen eine Opsonisierung nach Bindung von Komplementfaktoren im weiblichen Genitaltrakt nach, der zu einer gesteigerten Phagozytose der Spermatozoen durch Makrophagen führte.

1.4 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, mittels indirekter Immunfluoreszenz die bevorzugten Bindungsregionen von SpAk aus Seminalplasma an Spermatozoen zu markieren. Außerdem wurden Korrelationen zwischen diesen Bindungsregionenn und den Parametern der Patienten-Ejakulate, denen die SpAk entstammten, gesucht.

2 Material und Methodik

2.1 Arbeitsprinzip (Zusammenfassung)

Im Zeitraum von Oktober 1997 bis Februar 1999 wurden 25 Spender- und 44 Patientenproben gewonnen.

Objektträger wurden mit aufbereiteten Spender-Ejakulaten mit nach WHO-Kriterien normalen Parametern beschichtet. Diese Präparate inkubierten wir mit vorbereiteten Patienten-Seminalplasmen, die SpAk enthielten. Im nächsten Schritt wurde ein Fluorochrom hinzugefügt und die SpAk-markierten Präparate und die Kontrollen (s. Kap.2.4.3) unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2 Immunfluoreszenz

2.2.1 Prinzip

Die Immunfluoreszenz macht sich zunutze, daß freie Aminogruppen des Immunglobulin-Moleküls mit reaktionsfähigen Gruppen geeigneter Fluorochrome (Sulfochlorid- oder Isozyanatgruppen, bei Cy5 Isothiozyanatgruppen) gekoppelt werden können, ohne daß die spezifische Affinität des Immunglobulins zum homologen Antigen beeinträchtigt wird. Ziel einer Kopplungsreaktion ist ein Konjugat, das einen nach Möglichkeit hohen Anteil markierter Immunglobuline, aber kaum freie Fluorochrommoleküle enthält, da diese ein unspezifisches, mehr oder weniger starkes Hintergrundleuchten bewirken würden.

Das Konjugat läßt man meist auf Objektträgerpräparate einwirken, auf denen die nachzuweisende immunologische Komponente (Spermatozoen) fixiert ist.

Zu unterscheiden sind direkte und indirekte Immunfluoreszenztests: Beim indirekten Fluoreszenztest ist - anders als beim direkten Fluoreszenztest - der erste verwendete Antikörper nicht fluoreszenzgekoppelt, sondern erst ein zweiter Antikörper, der gegen den ersten gerichtet ist (z.B. Anti-Kaninchen-IgG, wenn der erste Antikörper vom Kaninchen stammt).

Die Immunkomplexe heben sich im Fluoreszenztest als hell-leuchtende Strukturen vom Untergrund ab, so daß sich der Sitz des Antigens lokalisieren läßt.

2.2.2 Fluorochrome

Fluorochrome zeigen eine charakteristische chemische Struktur, von der die Wellenlänge, die den Fluoreszenzstoff zum Leuchten bringt, abhängt. Meist handelt es sich um ein Bündel mehrerer nebeneinander liegender Wellenlängen (dann auch als Anregungs- oder Immissionsspektrum bezeichnet). Die Mehrzahl der Fluorochrome sind Derivate des Fluoresceins (Fluoreszenzemissionsmaximum 519 nm) und des Rhodamins (566/567 nm); am häufigsten wurden bisher Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Tetramethylrhodaminisothiocyanat zur Herstellung fluoreszierender Antikörper verwendet. Relativ neu ist hingegen die Verwendung von Cyanin-Derivaten (Cy2: 508 nm, Cy3: 540 nm, Cy5: 645 nm). Die verwendeten Farbstoffe müssen sich stöchiometrisch, quantitativ und reproduzierbar an die unterschiedlichen Zellkompartimente binden.

Wessendorf und Brejle (1992) verglichen die Qualitäten von FITC, Tetramethylrhodamin, Lissamin-Rhodamin, Texas-Red und Cyanin 3.18 (Cy3). Cy3 markierte die Konjugate deutlich heller und spezifischer als die restlichen Fluorochrome. Auch in unseren Untersuchungen konnten wir bei Vorversuchen die höchste Photostabilität und Fluoreszenzausbeute mit Ziege-antihuman - IgA+IgG+IgM (H+L)-Cy5 erzielen, das außerdem eine höhere Langzeitstabilität mit den organischen Eindeckmedien als FITC zeigte.

2.3 Verwendete Proben und ihre Untersuchung

2.3.1 Spender

Wir verwendeten die Ejakulate von freiwilligen Spendern, die eine 4-tägige sexuelle Karenz eingehalten hatten. Ihre Ejakulate wurden nach einer 3-5tägigen sexuellen Karenz durch Masturbation gewonnen und im Routinelabor untersucht. Die Parameter mußten eine Normozoospermie nach WHO-Kriterien aufweisen.

2.3.2 Patienten

Auch die Patienten-Ejakulate wurden nach einer 3-5tägigen sexuellen Karenz durch Masturbation gewonnen. Verwendet wurden Ejakulate von insgesamt 44 Patienten aus der andrologischen Sprechstunde, die sich nach einer Vasektomie oder mit unerfülltem Kinderwunsch vorgestellt hatten.

Die SpAk-haltigen Seminalplasmen wurden bei 3000g für 15 min. abzentrifugiert und bei –20°C eingefroren.

2.3.3 Ejakulatuntersuchung

Sie erfolgte nach den Richtlinien der WHO (1993) im Routinelabor. Folgende Parameter wurden für diese Arbeit übernommen: Verflüssigungszeit, Menge, Konsistenz, pH-Wert, Spermatozoen-Dichte (Spermatozoenzahl in Millionen pro Ejakulat und pro Milliliter).

Die Spermatozoen-Motilität (bewegliche, unbewegliche, lokal bewegliche) wurde mit dem CASA-System der Firma Mika-Medical, Montreaux gemessen.

Die Spermatozoen-Vitalität ermittelten wir mit Hilfe des Eosin-Tests. Hierbei werden Spermatozoen in eine Eosinlösung eingebettet; nur die membrangeschädigten Spermatozoen nehmen den Farbstoff auf (Eosin-positiv).

Ferner bestimmten wir die Spermatozoen-Morphologie (lichtmikroskopische Auszählung) und die Akrosin-Aktivität (enzymatische Messung).

Im hypoosmolaren Schwelltest (HOS-Test) schwellen die Flagellen von Spermatozoen mit intakten Membranen und normaler Vitalität an, wobei ein Anteil von unter 60% geschwollenen Spermatozoen als pathologisch gilt [Jeyendran et al., 1984]. Ein Zusammenhang eines pathologischen HOS-Testes mit herabgesetzter Fertilisierungskapazität wurde kontrovers diskutiert [Jeyendran et al., 1984, Van den Saffele et al., 1992, Smith et al., 1992].

2.3.4 MAR-Test

Die SpAk wurden mittels indirektem MAR-Test in den Ejakulaten der Patienten nachgewiesen: hierbei werden den frisch gewonnen Ejakulaten Latexpartikel zugesetzt, die an ihrer Oberfläche mit humanen Spermatozoen-Antikörpern (Typ IgG) besetzt sind. Gleichzeitig wird ein monospezifisches Anti-human-Immunglobulin-Antiserum (anti-IgG) hinzugefügt. In Gegenwart von SpAk im Ejakulat des Patienten kommt es aufgrund der Bindung der im zugesetzten

Antiserum vorliegenden bivalenten Immunglobulinantkörper an die Spermatozoen-Antikörper (die sowohl auf den Latexpartikeln als auch auf der Zelloberfläche der Spermatozoen vorliegen) zur Bildung von Mischagglutinen aus Partikeln und Spermatozoen (Übersicht in: Bronson et al., 1984).

2.4 Aufbereitung und Inkubation der Proben

2.4.1 Waschen und Fixierung

Zum Waschen wurden die Ejakulate mit PBS-Puffer in der Relation 1:2 im Reagenzglas gemischt und für 10 Minuten bei 3000g zentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstandes und entsprechender Beschichtung mit PBS-Puffer wurde dieser Schritt wiederholt; schließlich wurde erneut abdekantiert und zur Isolierung der vitalen Spermatozoen ein Swim-up durchgeführt.

a) Methanol - Fixierung:

Jeweils 10µl der so gewonnenen Spermatozoen wurden auf einen Objektträger pipettiert, dünn ausgestrichen und mittels eines Tropfens Methanol fixiert. Die Präparate waren durch diese Fixierung für einen sehr langen Zeitraum verwertbar [Nardone, 1985].

b) Poly-L-Lysin - Beschichtung:

Mehrfach wurden negative Einflüsse der Methanol-Fixierung auf die Integrität der akrosomalen Membranen und der Plasmamembranen von Spermatozoen [u.a. Gilbert et al., 1988] beschrieben. Auch in unserer Arbeit leuchteten die Methanol-fixierten Spermatozoen deutlich diffuser, was wir auf eine teilweise Zerstörung der Membranen zurückführten.

Bei Verwendung von Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern ließen sich die Spermatozoen spezifischer anfärben. Das Auftragen der Antikörper und die mikroskopische Auswertung schlossen sich dann unmittelbar an die Inkubation an.

2.4.2 Inkubationen

Die bei -20°C tiefgefrorenen, SpAk-haltigen Seminalplasmen wurden aufgetaut und mit bovinem Serum-Albumin (BSA) im Verhältnis 1:2 verdünnt. BSA, mit dem sich leichter arbeiten ließ als mit der ebenfalls erprobten verdünnten Gelatine, diente auch zur Blockierung der unspezifischen Bindungen. Nach dem Beschichten der Objektträger mit ca. 200µl verdünnten Seminalplasmas verschiedener Patienten wurden diese entweder für ca. 24 Stunden bei 4°C oder für ca. eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im anschließenden Waschschrift (mit BSA) wurden ungebundene SpAk vom Präparat entfernt.

Unter abgedunkeltem Licht wurde das verwendete Fluorochrom Cy5 im Verhältnis 1:200 (FITC 1:30) ebenfalls mit BSA verdünnt. Mit je ca. 200 µl des verdünnten Fluorochroms als zweitem Antikörper wurden die Objektträger erneut wie im vorhergehenden Schritt inkubiert und anschließend gewaschen.

2.4.3 Kontrollen

Eine Testreihe bestand aus 5 Objektträgern mit verschiedenen Patienten-Seminalplasmen. und zwei Kontrollen:

- Ein präparierter Objektträger war mit MAR-negativem Seminalplasma (ohne SpAk) beschichtet.

- Ein weiterer präparierter Objektträger wurde unter Auslassung eines Seminalplasmas nur mit dem zweiten Antikörper (Cy5) beschichtet.

2.5 Auswertung

Voraussetzung für die Auszählung eines Objektträgers und Aufnahme der Ergebnisse in die Statistik waren helle, klar fluoreszierende Markierungen an den Spermatozoen, eine geringe Partikelzahl und fehlendes Hintergrundleuchten auf den Präparaten.

Objektträger mit Seminalplasmen von 44 Patienten wurden ausgewertet.

Pro Objektträger wurden jeweils 100 Spermatozoen ausgezählt, wobei sowohl jene Spermatozoen berücksichtigt wurden, auf deren Oberfläche Antikörper jeweils nur an eine einzige Stelle banden als auch solche, an denen die Antikörper an zwei oder drei verschiedenen Stellen banden. Drei verschiedene Bindungsregionen wurden differenziert: Die Akrosomregion, das Mittelstück und das Flagellum. Zur fotografischen Dokumentation wurden Umkehr-Filme mit einer Empfindlichkeit von 400 ASA in einer Contax-139 Kamera, aufgesetzt auf ein Fluoreszenzmikroskop Leica, Typ DMRE, verwendet.

Schließlich wurden die so gewonnenen Ergebnisse folgenden Ejakulat-Parametern gegenübergestellt:

- Akrosin-Aktivität (Normwert: $0,6-2,0 \text{ mU}/10^6$ isolierte Spermatozoen)
- Anteil vitaler Spermatozoen (Normwert $\geq 50\%$)
- Anteil motiler Spermatozoen (Normwert $\geq 50\%$)

3. Ergebnisse

3.1 Bindungsverhalten der Spermatozoen-Autoantikörper (SpAk)

Es wurde die Bindung von SpAk aus 44 verschiedenen Seminalplasmen an den Spermatozoen nachgewiesen:

Die SpAk aus Seminalplasmen von 33 (75,0%) Patienten banden an das Mittelstück: Beispiel in Abb. 2 + 3.

Von diesen banden 17 (38,6% d. Gesamtzahl) ausschließlich an das Mittelstück, 5 (11,4%) zusätzlich an die Akrosomregion, 7 (15,9%) zusätzlich an Mittelstück und Schwanz und 4 (9,1%) zusätzlich an Akrosomregion und Schwanz (s. Tab.1).

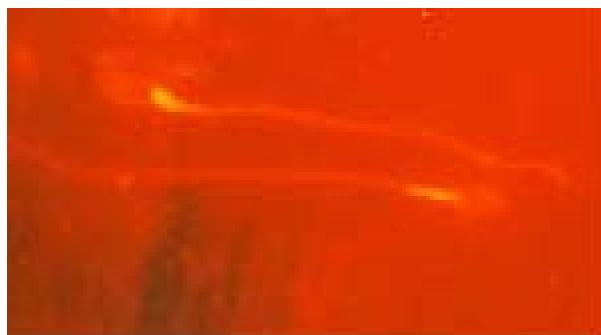
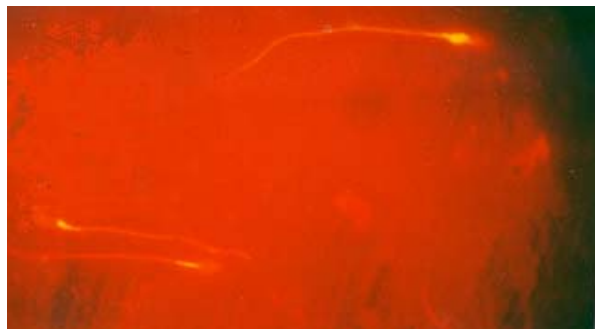


Abb. 2+3: Humane Spermatozoen mit am Mittelstück markierten SpAk; Fluorochrom: FITC



Abb. 4: Humanes Spermatozoen mit am Mittelstück gebundenen SpAk; Fluorochrom: FITC

Die SpAk aus Seminalplasmen von 15 (34,1%) Patienten banden an die Akrosomregion: Beispiel in Abb. 5.

Von diesen banden 6 (13,6% d. Gesamtzahl) ausschließlich an die Akrosomregion, 5 (11,4%) zusätzlich an das Mittelstück und 4 (9,1%) zusätzlich an Mittelstück und Schwanz.



Abb. 5: Humanes Spermatozoen mit an Akrosomregion und Mittelstück gebundenen SpAk; Fluorochrom: Cy5

Die SpAk aus Seminalplasmen von 16 (36,4%) Patienten banden an den Spermatozoen-Schwanz, und zwar vor allem unterhalb des Mittelstückes, selten an das distale Ende: Beispiel in Abb. 6.

Von diesen banden 5 (11,4%) ausschließlich an den Schwanz, 7 (15,9%) zusätzlich an das Mittelstück und 4 (9,1%) an Mittelstück und Akrosomregion. In keinem der Fälle (0%) banden SpAk ausschließlich an Akrosomregion und Schwanz.

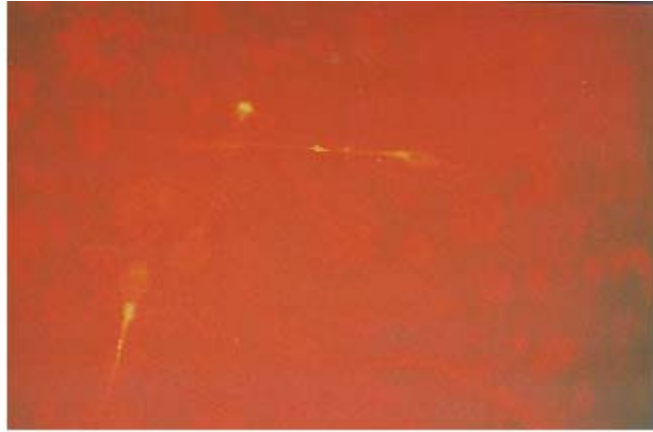


Abb. 6: Humane Spermatozoen mit am Schwanz gebundenen, Cy5-markierten SpAk

24 SpAk (54,5%) banden an mehrere Stellen gleichzeitig und weitere 20 (45,5%) an jeweils eine einzige Stelle (s. Tab.1+2, Schema 1+2).

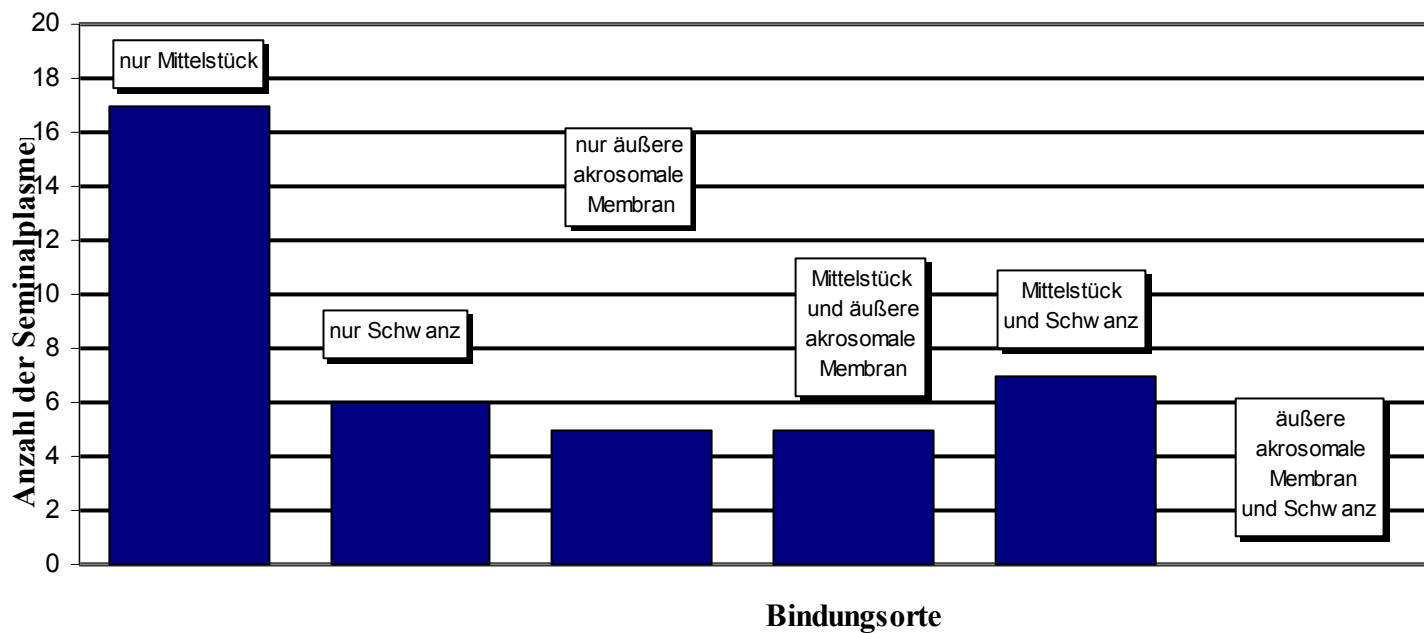
M	A	S	M + A	M + S	A + S	M + A + S
17	6	5	5	7	0	4
38,6%	13,6%	11,4%	11,4%	15,9%	0%	9,1%

M.....Mittelstück

A.....Akrosomregion

S.....Schwanz

Tab. 2: Bindungsregionen der SpAk - Häufigkeitsverteilung



Schema1: Bindungsregionen der SpAk - Häufigkeitsverteilung

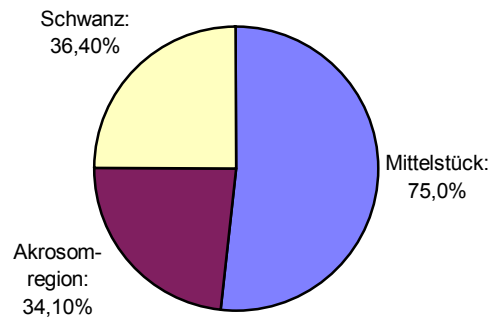
Mittelstück (M)	Akrosomregion (A)	Schwanz (S)
33	15	16
75,0%	34,1%	36,4%

Tab. 3: Gesamtanzahl der gebundenen SpAk

M.....Mittelstück

A.....Akrosomregion

S.....Schwanz



Schema 3: Gesamtverteilung der gebundenen SpAk

3.2 Bindungsregionen und Ejakulatparameter

3.2.1 Assoziation von Spermatozoen-Autoantikörpern (SpAk) an der Akrosomregion und veränderter Akrosin-Aktivität

SpAk von 15 verschiedenen Patienten banden bei unseren Versuchen an die Akrosomregion.

10 der entsprechenden Patienten-Ejakulate hatten im Befund Akrosin-Aktivitäten außerhalb des Normbereiches ($1,4-2,0\text{mU}/10^3\text{ Spz}$) aufgewiesen:

- Bei 5 Ejakulaten lag die Akrosin-Aktivität oberhalb des Normbereiches;
- Bei 5 Ejakulaten lag die Akrosin-Aktivität unterhalb des Normbereiches.

Die SpAk der restlichen 5 Ejakulate kamen von Patienten mit Zustand nach Vasektomie (keine Spermatozoenparameter meßbar).

Somit wiesen die Ejakulatbefunde von allen nicht-vasektomierten Patienten (100,0%), bei denen SpAk an die Akrosomregion gebundenen hatten, Akrosin-Aktivitäten oberhalb oder unterhalb des Normbereiches auf.

3.2.2 Assoziation von Spermatozoen-Autoantikörpern (SpAk) an Spermatozoen-Mittelstück und -Schwanz und herabgesetzter Vitalität

SpAk aus Ejakulaten von 38 verschiedenen Patienten banden bei unseren Versuchen an Mittelstück und/oder Schwanz.

4 dieser Ejakulate hatten im Eosin-Test eine Spermatozoen-Vitalität unterhalb des Normbereiches ($\geq 50\%$ vitale Spermatozoen) gezeigt:

14 dieser Ejakulate kamen von Patienten mit Zustand nach Vasektomie.

20 dieser Ejakulate hatten im Eosin-Test eine normale Spermatozoen-Vitalität aufgewiesen.

Ergebnis: Somit wiesen lediglich 4 von 24 Ejakulatbefunden (16,67%) von nicht-vasektomierten Patienten, bei denen SpAk an Mittelstück oder Schwanz gebunden hatten, eine erniedrigte Vitalität auf.

Der HOS-Test zeigte bei Spermatozoen mit an Schwanz oder Mittelstück gebundenen SpAk mit $M=79,33\%$ im Normbereich ($>60\%$ vitale Spermatozoen) liegende Ergebnisse.

3.2.3 Assoziation von Spermatozoen-Autoantikörpern (SpAk) an Spermatozoen-Mittelstück und -Schwanz und herabgesetzter Motilität

SpAk aus Ejakulaten von 38 verschiedenen Patienten banden bei unseren Versuchen an Mittelstück und/oder Schwanz.

6 dieser Ejakulate hatten im Befund eine herabgesetzte Gesamt-Motilität gezeigt: (Normwert >50%).

16 dieser Ejakulate kamen von Patienten mit Zustand nach Vasektomie.

16 dieser Ejakulate wiesen im Befund eine normale Motilität auf.

Ergebnis: Somit wiesen 6 von 22 Ejakulatbefunden (27,27%) von nicht-vasektomierten Patienten, bei denen SpAk an Mittelstück oder Schwanz gebunden hatten, eine erniedrigte Motilität auf.

Bei diesen Ejakulaten lagen auch weitere Motilitätsparameter außerhalb der Normbereiche:

- Mittelwert des Anteiles progressiv motiler Spermatozoen (WHO-Kategorien a und b): 14,8% (Normbereich: >25%);
- Mittelwert des Anteiles linear motiler Spermatozoen an allen progressiv-motilen Spermatozoen (WHO-Kategorie a): 16,75% (Normbereich: >25%);
- Mittelwert des Anteiles nichtlinear motiler Spermatozoen an allen progressiv-motilen Spermatozoen: (WHO-Kategorie b): 83,25% (Normbereich: <50%).

- Der Mittelwert des Anteiles der lokal-beweglichen Spermatozoen (WHO-Kategorie c) lag mit 13,0% im Normbereich.
- Der Mittelwert des Anteiles imotiler Spermatozoen Spermatozoen (WHO-Kategorie d) lag bei 72,2%.

Die mittlere Geschwindigkeit der progressiv-motilen Spermatozoen (WHO-Kategorien a und b) dieser Ejakulate lag mit 27,2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ im unteren Normbereich (Normwert $\geq 25 \mu\text{m}/\text{sec}$).

4. Diskussion

Die Untersuchungen bezüglich des Bindungsverhaltens von SpAk an Spermatozoen ergaben folgende Verteilung: 75,0% der verwendeten SpAk banden an das Mittelstück, 34,1% an die Akrosomregion und 36,4% an das Flagellum. 54,5% der SpAk banden an mehrere Regionen gleichzeitig und 45,5% banden jeweils an eine einzige.

Ejakulatbefunde von allen (100,0%) nicht-vasektomierten Patienten, bei denen SpAk an die Akrosomregion gebunden hatten, wiesen eine abnorm hohe oder niedrige Akrosin-Aktivität auf.

27,3% der Ejakulatbefunde von nicht-vasektomierten Patienten, bei denen SpAk an Schwanz oder Mittelstück gebunden hatten, wiesen eine abnorm niedrige Motilität und 16,7% eine abnorm niedrige Vitalität auf.

Die Bindungsregionen von SpAK am Spermatozon im Zusammenhang mit bestimmten Ejakulatparametern wurden bisher nur selten untersucht. Zudem differieren die entsprechenden Ergebnisse in den verschiedenen Arbeiten teilweise erheblich.

Day (1996) untersuchte die Markierungen von SpAk aus Pferdehengsten mittels indirekter Immunfluoreszenz. Dabei zeigten sich intensive Markierungen an Kopf und Schwanz; das Mittelstück blieb in diesen Versuchen unmarkiert.

Mittels indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie fanden Sinton et al. 1991 eine Verteilung der Bindung von jeweils 29,4% der aus Seminalplasma stammenden SpAk auf Mittel- und Schwanzstück, sowie von 41,2% auf den Spermatozoen-Kopf.

In beiden vorgenannten Arbeit wurden jedoch die Ejakulatausstriche mittels Lufttrocknung und z.T. Methanol fixiert. Dieser Technik wurde mehrfach ein

schädlicher Einfluß auf die Plasmamembranen der Spermatozoen zugeschrieben [Haas et al., 1988]. Dadurch können normalerweise intern liegende Antigene freigelegt werden und zu falsch-positiven Resultaten führen [Bronson et al., 1984]. Aus diesen Gründen verzichteten wir auf eine Fixierung, sondern werteten die Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger unmittelbar nach dem Auftragen der Antikörper aus (s.o.).

Wolf et al. stellten 1995 mittels Immunobead-Test eine gleichmäßige Verteilung der SpAk-Bindungen über das gesamte Spermatozon fest. Lediglich in der Testgruppe, in der unter 80% der Spermatozoen IgG-Antikörper gebunden hatten, zeigten 50% der Spermatozoen gebundene Antikörper am Flagellum und 50% am Kopf. Die Fertilisierungsrate war bei der Gruppe mit Kopf-gebundenen SpAk insignifikant höher als bei der Gruppe mit Schwanz-gebundenen SpAk.

Bronson et al. untersuchten 1982 mittels Immunobead-Test das Bindungsverhalten von SpAk am Spermatozoen-Schwanz und deren Einfluß auf die Motilität. Hierbei zeigte sich die Motilität am deutlichsten reduziert bei SpAk -Bindung der Klassen IgA und IgG an die distalen Abschnitte des Schwanzes und nahezu unbeeinflusst bei Bindung an die Schwanzspitze. IgM banden hingegen ausschließlich an den Schwanz und hatten auch bei Lokalisation an der Schwanzspitze einen deutlich inhibierenden Einfluß auf die Motilität. Kopfgebundene Antikörper aller Klassen hatten keinen Einfluß auf die Motilität.

Aufgrund der Größe der Marker ist der Immunobead-Tests zur Lokalisierung von Antigenen im Gegensatz zur Technik der Immunfluoreszenz jedoch weniger gut geeignet. Young und Smithwick (1991) fanden bei Verwendung des indirekten Immunfluoreszenztestes und des indirekten Immungold-Testes die deutlichsten Markierungen am Mittelstück, gefolgt von Kopf und Hauptstück des Flagellums; diese Ergebnisse sind den unseren sehr ähnlich. Einzig im Immunobead-Test zeigte sich eine hiervon abweichende Verteilung, wobei hier die Kopfbindungen überwogen. Einflüsse auf Ejakulatparameter wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Jones und Aust bezeichneten 1980 die Bindung von Fluorochromen an Äquatorial-Segment, Genick und Mittelstück – allerdings ohne diese These weiter auszuführen - grundsätzlich als unspezifisch.

Problematisch ist bei der Laboruntersuchung von SpAk das Fehlen eines standardisierten und allgemein anerkannten Verfahrens. Keines der gängigen Verfahren ist verlässlich genug für eine zuverlässige Diagnostik der klinischen Relevanz. Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Antikörper und unerfülltem Kinderwunsch ist nicht in jedem Falle zu beweisen [Helmerhorst et al., 1999]. Zur Beantwortung der Frage, ob SpAk ein Grund für Infertilität sind, fordern Taylor und Collins (1992) größere umfangreiche Studien, basierend auf einem neu zu entwickelnden Diagnoseverfahren und angewandt an bisher unbehandelten Paaren.

Die Effekte von SpAk auf die Interaktion der Gameten scheinen in vitro z.T. deutlich zu variieren, so fanden z.B. Aitken et al. 1988 in den meisten untersuchten Fällen eine Hemmung der Spermatozoen-Bindung an die Zona pellucida, paradoxerweise jedoch auch in einem geringen Anteil eine vermehrte Zona-Pellucida-Bindung, [Bronson et al., 1981]. Bei einer groß angelegten Studie müßten sehr viele verschiedene Gruppen unterschiedlich reagierender Paare differenziert werden. Angesichts einer geschätzten Inzidenz von ca. 15% an Paaren mit immunologisch bedingter Infertilität und der Uneinheitlichkeit der an den verschiedenen Zentren etablierten Testverfahren zieht Bronson (1999) den Schluß, daß es in naher Zukunft kaum möglich sein wird, eine multizentrische Studie, wie sie von Taylor und Collins gefordert wird, durchzuführen.

Die möglichen Einflüsse der SpAk auf die Fertilität bestehen zum einen in der Beeinflussung des Spermatozoen-Transports - in dieser Arbeit wurden dafür modellhaft Motilität und Vitalität gemessen. Zum anderen beschrieben viele

Arbeiten Einflüsse der SpAk auf die Interaktion der Keimzellen. In unserer Arbeit wurden daher der Zusammenhang von Akrosin-Aktivitäten und SpAk untersucht.

Sämtliche MAR-positiven Ejakulatbefunde von nicht-vasektomierten Patienten, bei denen SpAk an die Akrosomregion gebunden hatten, wiesen eine abnorm hohe (50,0%) oder niedrige (50,0%) Akrosin-Aktivität auf.

Angesichts der vielschichtigen Abläufe von Kapazitation und Akrosomreaktion böten sich hier viele Möglichkeiten der Störung durch SpAk etwa durch Veränderung der akrosomalen Membranen bzw. der Plasmamembran. Auch Eingriffe in die verschiedensten hieran beteiligten enzymatische Reaktionen wären denkbar. Diese Möglichkeiten könnten in einer Störung der Spermatozoen-Ei-Bindung und -Interaktion führen.

So wurden teils steigernde, teils deutlich hemmende Einflüsse von SpAk auf die Interaktion der Spermatozoen mit der Zona pellucida beschrieben [u.a. Aitken et al., 1988; Zouari und de Almeida, 1993] und durch eine verstärkte Adhärenz der Spermatozoen an das Oolemma [Bronson, 1990] erklärt.

Schon 1983 fand Bronson eine mögliche Blockierung der Spermatozoen-Bindungsstellen durch SpAk.

Neutrophile Granulozyten und Komplementfaktoren sind physiologisch im weiblichen Genitaltrakt vorhanden. Normalerweise werden die akrosomale und die Plasmamembran der Spermatozoen durch Expression von Komplementinhibitoren wie CD35, CD46 (Membran-Kofaktorprotein) und CD59 (Inhibitor membranschädigender Komplexe) vor Schäden geschützt. CD 55 trägt zur Expression des Decay-accelerating-Factor bei, der den Abbau der Komplementfaktoren auf körpereigenen Zellen beschleunigt. Diese Komplementinhibitoren werden möglicherweise durch SpAk blockiert [D'Cruz und Haas, 1993], was zur Schädigung der Plasma- und der akrosomalen Membranen führen würde. Die entsprechenden Akrosin-Aktivitäten könnten

hierdurch beeinflusst werden. Jairaj et al. (2000) fanden allerdings nach Zugabe von SpAk zu gesunden Spermatozoen keinen negativ beeinflussten HOS-Test.

Schließlich inhibierten SpAk die Kapazitation [Bandoh et al., 1992] und – sowohl spontan als auch künstlich induziert – die Akrosomreaktion [Tasdemir et al., 1995]. Andererseits konnten Macumdar und Levine (1998) zeigen, daß es durch gegen die akrosomale Region gerichtete SpAk - nach unseren Ergebnissen 34,1% aller SpAk - bereits vor der Kapazitation zu einer Freilegung der Antigene der inneren akrosomalen Membran kommen kann. Die Spermatozoen-Ei-Bindung wurde dadurch behindert.

Eine weitere Frage ist, auf welche Weise der Zusammenhang zwischen SpAk-Bindung an Mittel- und Schwanzstück und reduzierter Motilität zu erklären ist (27,3% der Ejakulate von nicht-vasektomierten Patienten waren betroffen). Möglicherweise kommt es durch die Bindung der SpAk an das Mittelstück zu einer Verminderung der hier normalerweise reichlich vorhandenen, für die Energieversorgung und damit für die Motilität essentiellen Mitochondrien oder zu einer negativen Beeinflussung ihrer Funktion.

Der Zusammenhang zwischen SpAk-Bindung an Mittel- oder Schwanzstück und reduzierter Vitalität ist weniger signifikant (betroffen sind 16,7% der Ejakulate von nicht-vasektomierten Patienten). In diesen Fällen könnten etwa direkte Schädigungen der Spermatozoen-Membranen durch SpAk zu positiven Eosin-Tests bzw. zu geringerer Schwellfähigkeit im HOS-Test geführt haben.

Viele Untersuchungen [u.a. Jager et al., 1981; Bronson et al., 1984] beschrieben eine Korrelation zwischen SpAk-Konzentration im Ejakulat und Fähigkeit der Spermatozoen, in den zervicalen Mucus einzudringen. Jager und Kremer beschrieben 1984 einen deutlichen Zusammenhang zwischen Auftreten von SpAk bei jeweils einem Partner infertiler Paare und einer verminderten Interaktion zwischen Spermatozon und zervikalem Mucus. Auch in unserer Arbeit fanden wir eine deutlich herabgesetzte Motilität bei 54,5% der Spermatozoen mit Schwanz-

gebundenen SpAk. Bronson (1987) erklärte diesen Effekt durch eine SpAk-bedingte verstärkte Anfälligkeit der Spermatozoen für komplement-vermittelte Membran-Schäden beim Eintritt in den weiblichen Genitaltrakt. 1992 konnten Kremer und Jager diese Antikörper der Klasse IgA zuordnen.

Andere Autoren wiederum erkannten eine verstärkte Agglutination als Ursache der herabgesetzten Motilität der Spermatozoen unter Einfluß von SpAk [u.a. Wilson und Fjällbrant, 1965]. Menge und Breitner ermittelten 1989 eine deutliche Beziehung zwischen agglutinierendem Effekt von SpAk und Immobilisierung der Spermatozoen: In allen Fällen hemmten die Antikörper die Motilität der morphologisch veränderten Spermatozoen und ihre Penetration in den zervikalen Mucus. Auch bei unseren Ergebnissen war die Motilität der Spermatozoen mit Schwanz-gebundenen SpAk stärker eingeschränkt als die Vitalität (s. Kap. 3.2).

Therapiemöglichkeiten der SpAk-induzierten Infertilität

- Die Unterdrückung der SpAk-Produktion durch Corticosteroide: Erfolge hinsichtlich der gemessenen SpAk-Konzentrationen und zuvor bestehender Oligozoospermien erzielte man mittels kontinuierlicher Prednison-Gabe über 7 Tage oder mittels Methylprednisolon-Gabe über 12 Tage [Hendry et al., 1979; Smarr et al., 1988]. Verschiedene Doppelblindstudien sprechen allerdings gegen diese Technik und beschreiben eine geringe Effizienz, wenig konstante Ergebnisse und z.T. erhebliche Nebenwirkungen [u.a. Haas und Manganiello, 1987].
- Die Selektion SpAk-freier Spermatozoen durch Immunobead-Absorption bzw. Waschen. Diese Technik wäre nur bei einem geringen Anteil der Patienten anwendbar und böte keinen Vorteil gegenüber der IVF-Behandlung [Verheyen

et al., 1994]. Verdünnen und Waschen führen laut Jeulin et al. (1989) nur zu einem geringen Rückgang der SpAk-Bindung, und dies auch lediglich bei IgG.

- Die Verwendung reproduktionsmedizinischer Verfahren wie Intrauterine Insemination (IUI), In-vitro-Fertilisation (IVF) oder Intrazytoplasmatische Spermien-Injektion (ICSI).

Auch noch seit Entwicklung der ICSI empfehlen viele Autoren – nicht zuletzt aus Kostengründen – zunächst die Anwendung der IVF bei SpAk-bedingtem unerfülltem Kinderwunsch. So wird für ICSI mit Hinweis auf die fehlende Selektionsbarriere ein höheres Risiko für Chromosomenaberrationen als bei IVF diskutiert. Andererseits wird darauf hingewiesen, daß die als Selektionsbarriere verstandene Zona pellucida auch in vivo nicht gegen chromosomal aberrante Spermatozoen selektiert, sondern gegen morphologisch und funktionell gestörte Spermatozoen, die selbst bei Patienten mit schwerem OAT-Syndrom nicht häufiger auftreten als bei fertilen Männern [Krause und Weidner 1998, Kap.3.4.1.10].

Die Zahl der erzielten Schwangerschaften nach IVF ist bei MAR-positiven Patienten deutlich niedriger als bei MAR-negativen [u.a. Ünlü et al., 1990]. Neben SpAk können auch Antiphospholipid-Antikörper (APA) und Anti-Zona-pellucida-Antikörper (AZA) den Erfolg der IVF-Therapie beeinflussen: Mardesic et al. (2000) zeigten, daß die Fertilisierungsrate durch SpAk deutlich stärker beeinträchtigt wurde als durch APA, aber weniger stark als durch AZA. Oft werden vor dem Einsatz der effektiveren ICSI vergebens mehrere Zyklen der IVF-Behandlung durchgeführt.

Viele Studien beschreiben eine Unabhängigkeit der Erfolgsrate bei ICSI vom Ergebnis des MAR-Testes:

Nagy et al. berichteten 1995 von Erfolgen bei der Behandlung der männlichen Infertilität mittels ICSI: es wurden bei 37 MAR-positiven Patienten, die vorher z.T.

erfolglos mit konventionellen Methoden therapiert wurden, 55 Behandlungszyklen durchgeführt, die Fertilisationsrate lag bei 75,7%. Bei Insemination von Spermatozoen MAR-negativer Patienten im Laufe von 1767 Zyklen lag die Fertilisationsrate bei 69,2%. Die embryonale Entwicklung war in beiden Patientengruppen vergleichbar, allerdings war der APGAR-Index (ein Punktesystem zur postnatalen Vitalitätsbeurteilung anhand bestimmter Befunde) bei Neugeborenen MAR-positiver Patienten niedriger. Die Studie zeigte außerdem, daß Fertilisation und embryonale Entwicklung weder signifikant vom Immunglobulin-Typ noch von der Lokalisation der SpAk am Spermatozon beeinflusst wurden. Nach wie vor fallen bei ICSI-Therapie eine hohe Abortrate (ca.25%) und eine hohe Rate an Mehrlingsgeburten auf: ca. 22% Zwillinge und 1,5% Drillinge [Mazumdar und Evine, 1998].

Auch Lahteenmaki et al. erzielten 1995 vergleichbare Fertilisationsraten bei MAR-positiven (79-89%) und MAR-negativen (68-93%) Patienten. Hingegen war die Fertilisationsrate dieser Patienten zuvor unter IVF-Therapie in dieser Studie mit 6% wesentlich niedriger.

1997 fanden Clarke et al. beim Vergleich zwischen MAR-positiven und MAR-negativen Patienten keine signifikanten Unterschiede bei Fertilisationsraten (62%/58%) und erzielten klinischen Schwangerschaften (19%/12%).

Hinsichtlich der Unabhängigkeit der erzielten Schwangerschaftsraten vom Ergebnis des MAR-Testes stellt sich die Frage nach dem Wert einer Untersuchung von Männern auf SpAk. Auch weitere Untersuchungen hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion erscheinen diskussionswürdig.

In der näheren Zukunft wird es bessere Methoden geben, die es erlauben, die fertilitätsrelevanten Antigene der SpAk darzustellen. Auf diese Weise könnte es zur Entwicklung von ELISA-Tests kommen, die mit Hilfe isolierter

fertilitätsrelevanter Antigene bei individuellen Paaren den jeweiligen Ort der Blockade identifizieren. Am Ende dieser Entwicklung könnte dann eine für jedes Paar individuelle Therapie stehen, die einer ICSI an Kosten und Aufwand deutlich überlegen sein könnte. In diesem Sinne wird die Antigenität der Spermatozoen sicher auch in Zukunft ein sehr wichtiger Bestandteil von Klinik und Forschung in Andrologie und Reproduktionsmedizin sein.

5. Zusammenfassung/Summary

Zielsetzung der Studie: Die genauen Bindungsregionen von Spermatozoen-Autoantikörpern (SpAk) im Zusammenhang mit abnorm veränderten Ejakulatparametern wurden bisher nur selten untersucht.

Mittels indirekter Immunfluoreszenz sollten die bevorzugten Bindungsregionen der aus Seminalplasma stammenden SpAk am Spermatozon markiert und so eine Häufigkeitsverteilung aufgestellt werden. Außerdem wurden Korrelationen zwischen diesen Bindungsregionen und den Parametern der Ejakulate, denen die SpAk entstammten, gesucht.

Aufbau der Experimente: Das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz beruht auf der Bindung eines fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers an einen gebundenen Primärantikörper (in diesem Falle an den am Spermatozon gebundenen SpAk). Objektträger wurden mit aufbereiteten Spender-Ejakulaten mit nach WHO-Kriterien normalen Parametern beschichtet. Anschließend erfolgte eine einstündige (37°C) bzw. 24-stündige (4°C) Inkubation mit SpAk-haltigen Seminalplasmen. Nach Waschen der Objektträger mit PBS-Puffer erfolgte die Beschichtung und Inkubation mit dem im Verhältnis 1:200 verdünnten Fluorochrom Ziege-antihuman-IgA+IgG+IgM (H+L)-Cy5 (Fluoreszenz-emissionsmaximum 645nm). Die Auswertung erfolgte nach erneutem Waschen unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Ergebnisse: Drei verschiedene Bindungsregionen der SpAk wurden differenziert: Die Akrosomregion, das Mittelstück und das Flagellum. Die so gewonnenen Ergebnisse wurden folgenden Ejakulatparametern gegenübergestellt: Akrosin-Aktivität (Normwert 1,4-2,0 mU/10³ isolierte Spermatozoen), Anteil vitaler Spermatozoen (Normwert ≥50%), Anteil motiler Spermatozoen (Normwert ≥50%). Es banden

- an das Mittelstück 75,0%,
- an die Akrosomregion 34,1%,
- an das Flagellum 36,4% der SpAk.

Dabei banden 54,5% der SpAk an mehrere Regionen gleichzeitig und 45,5 % an eine einzige Region.

Die Akrosin-Aktivität lag bei allen Ejakulatbefunden (100,0%) nicht-vasektomierter Patienten, bei denen SpAk an die Akrosomregion gebunden hatten, außerhalb des Normbereiches;

27,3% der Ejakulatbefunde von nicht-vasektomierten Patienten, bei denen SpAk an Flagellum oder Mittelstück gebunden hatten, wiesen eine abnorm erniedrigte Motilität auf.

16,7% der Ejakulatbefunde von nicht-vasektomierten Patienten, bei denen SpAk an Schwanz oder Mittelstück gebunden hatten, wiesen eine abnorm erniedrigte Vitalität auf.

Schlußfolgerungen: Die bevorzugten Bindungsregionen von SpAk an Spermatozoen lassen sich mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz präzise darstellen; die Ergebnisse der Auswertung sind allerdings im Gegensatz zu anderen Verfahren einer gewissen subjektiven Streuung durch den Auswerter unterworfen. Die negativen Einflüsse von SpAk auf die Fertilität wurden durch Korrelationen zwischen bevorzugten Bindungsregionen und entsprechenden Ejakulat-Parametern

deutlich. Weiterführende Untersuchungen der Antigenität der Spermatozoen könnten in Zukunft zu neuen Diagnoseformen führen, die Paare mit SpAk-bedingtem unerfülltem Kinderwunsch einer vollkommen individuellen Therapie ihrer Infertilität zuführen.

*

Aim of the study: Until now, specific areas of binding of sperm autoantibodies (SpAb) were described infrequently. Our intention was to tag the preferred areas of binding of SpAb from human seminal plasma on spermatozoa and to find a frequency of distribution for this. Furthermore, we were looking for correlations between these areas of binding and some parameters of those ejaculates, from which the SpAb descended.

Experimental Design: The principle of indirect immunofluorescence based on a fluorescence-coupled second antibody binding a primary antibody, which was bound to an antigen (in this case the SpAb bound to the spermatozoa). We coated slides with prepared ejaculates according to WHO standards. Subsequently we incubated them with seminal plasmas containing SpAb for 1 hour at 37°C or for 24 hours at 4°C. After washing the slides by PBS-buffer, we incubated them with the 1:200-diluted fluorochrome Cy5 (goat-antihuman-IgA+IgG+IgM [H+L]; maximum of fluorescence: 645nm). After rewashing, we analysed the slides by using a fluorescence microscope.

Results: We distinguished three different areas of binding: the acrosomal area, the neck and the flagellum: The results were juxtaposed with these parameters of ejaculate: activity of acrosine (reference value 1.4-2.0 mU/10³ isolated

Spermatozoa), share of vitale spermatozoa (reference value $\geq 50\%$), share of motile spermatozoa (reference value $\geq 50\%$).

- 75.0% of the spermatozoa were binding to the midpiece
- 34.1% to the acrosomal area
- 36.4% to the flagellum

54.5% of the spermatozoa were binding to more than one area, 45.5% were binding to one single area.

The activity of acrosine of all (100.0%) non-vasectomized patients with SpAb binding to the acrosomal region, was out of the reference value.

27.3% of all non-vasectomized patients with SpAb binding to the flagellum or the midpiece had an abnormal low value of motility.

16.7% of all non-vasectomized patients with SpAb binding to the flagellum or the midpiece had an abnormal low value of vitality.

Conclusions: Indirect immunofluorescence allows an accurate identification of the preferred areas of binding of SpAb on spermatozoa. Indeed in contrast to some other technique the results of this analysis depend on a certain degree of subjective dispersion caused by the analyser. The negative influences of SpAb on fertility were shown by correlations between preferred areas of binding and corresponding parameters of ejaculate. In the future, extended studies about antigenity of spermatozoa could lead to new kinds of diagnoses, which allow a completely individualized therapy for couples whose infertility is caused by SpAb.

Anhang:

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Elektronisches Schema einer Samenzelle nach Ånberg, 1956	10
Abb. 2+3: Humane Spermatozoen mit am Mittelstück markierten SpAk; Fluorochrom: FITC	24
Abb. 4: Humanes Spermatozoen mit am Mittelstück gebundenen SpAk; Fluorochrom: FITC	25
Abb. 5: Humanes Spermatozoen mit an Akrosomregion und Mittelstück gebundenen SpAk; Fluorochrom: Cy5	25

Literaturverzeichnis:

Aitken R.J., Parslow J.M., Hargreave T.B., Hendry W.F.: Influence of antisperm antibodies on human sperm function. Br J Urol 1988;62: 367-373

Anderson D.J., Johnson P.M., Alexander N.J., Jones W.R., Griffin P.D.: Monoclonal antibodies to spermatozoa: comparison with agglutination and immobilization tests. J Reprod Immunol 1987;10: 231-257

Alexander N.J., Anderson D.J.: Immunology of semen. Fertil-Steril 1987;47: 192-205

Auer J., Senechal H., De Almeida M.: Sperm-associated and circulating IgA and IgG classes of antibodies recognize different antigens on the human sperm plasma membrane. J Reprod Immunol 1997;34: 121-36

Bandoh H., Yamano S., Kamada M., Daitoh T., Aono T.: Effect of sperm-immobilizing antibodies on the acrosome reaction of human spermatozoa. Fertil Steril 1992;57:387-392

Barratt C.R.L., Havelock L.M., Harrison, I.E., Cooke, I.D., Int J Androl 1989;12: 110-116

Barros C., Crosby J.A., Moreno R.D.: Early steps of sperm-egg-interaction during mammalian fertilisation. *Cell Biology International* 1996;20: 33-39

Bohring C., Krause W.: The characterization of human spermatozoa membrane proteins - surface antigens and immunological infertility. *Electrophoresis* 1999;20: 971-976

Bronson R.A., Cooper G.W., Rosenfeld, D.L.: Ability of antibody-bound human sperm to penetrate zona-free hamster ova. *Fertil Steril* 1981;36: 778-783

Bronson R.A., Cooper G.W., Rosenfeld, D.L.: Correlation between regional specificity of antisperm antibodies to the spermatozoon surface and complement-mediated sperm immobilization. *Am J Reprod Immunol* 1982;2: 222-224

Bronson R.A., Cooper G.W., Rosenfeld D.: Sperm antibodies: Their role in infertility. *Fertil Steril* 1984;42: 171-183

Bronson R.A., Cooper G.W., Rosenfeld D. et al.: The effects of an IgA1 protease on immunoglobulins bound to the sperm surface and sperm cervical mucus penetration ability. *Fertil Steril* 1987;48: 505-507

Bronson R.A., Fusi F.M., Cooper G.W., Phillips D.L.: Antisperm antibodies induce polyspermy by promoting adherence of human sperm to zona-free hamster eggs. *Hum Reprod* 1990;5: 690-696

Bronson R.A.: Detection of antisperm antibodies: an argument against therapeutic nihilism. *Hum Reprod* 1999;14: 1669-1673

Clarke G.N., Bourne M., Baker H.W.G.: Intracytoplasmic sperm injection for treating infertility associated with sperm autoimmunity. *Fertil Steril* 1997;68: 112-117

Collins J.A., Burrows E.A., Yeo Y. et al.: Frequency and predictive value of antisperm antibodies among infertile couples. *Hum Reprod* 1993;8: 592-598

Cooper T.G., Yeung C.H., Nashan D., Jockenhövel F., Nieschlag E.: Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors on the assay of α -glucosidase in seminal plasma. *Int J Androl* 1990;13: 297-305

Czuppon A.B., Mettler L., Schauer R., Pawassar V.: Purification of human spermatozoal antigen. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem* 1981;362: 963-968

Davis R.O., Katz D.F.: Standardization and comparability of CASA-instruments. *J-Andrology* 1992;13: 81-84

Day M.J.: Detection of equine antisperm antibodies by indirect immunofluorescence and the tube-slide agglutination test. *Equine vet J* 1996;28: 494-496

D'Cruz O.J., Haas G.G. Jr.: The expression of the complement regulators CD46, CD55, and CD59 by human sperm does not protect them from antisperm antibody and complement-mediated immune injury. *Fertil Steril* 1993;59: 876-884

De Beer P.M., Windt M.L., Bouic P.J.: Analysis of human sperm membrane antigens reacting with sera from antisperm antibody positive and negative patients by western blotting. *Andrologia* 1993;25: 149-52

Flickinger C.J., Vagnetti M., Howards S.S., Herr J.C.: Antisperm autoantibody response is reduced by early repair of a severe vas deferens in the juvenile rat. *Fertil Steril* 2000;73: 229-237

Haas G.G. Jr., Manganiello P.: A double-blind, placebo-controlled study of the use of methylprednisolone in infertile men with sperm-associated immunoglobulins. *Fertil Steril* 1987;47: 295-301

Haas G.G., DeBault L.E., Nahhas F., D'Cruz O., Shuey R.: The effect of fixatives and/or air drying on the plasma membranes of human sperm. *Fertil Steril* 1988;50: 487-492

Halpern B.N., Ky T., Robert B.: Clinical and immunological study of an exceptional case of reaginic type sensitivity to human seminal fluid: *Immunology* 1967;12: 247-258

Handelsmann D.J.: Hypogonadismus und Infertilität bei systemischen Erkrankungen (in: Nieschlag E., Behre H.M.: *Andrologie - Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*, 1.Auflage, Springer-Verlag 1996, Kap.12)

Hargreave T.B.: *Male Infertility*, 2nd Edition, Springer-Verlag 1994

Hellstrom W.J.G.: *Male Infertility and Sexual Dysfunction*, Springer-Verlag 1997

Helmerhorst F.M., Finken M.J.J., Erwich J.J.: Detection assays for antisperm antibodies: what do they test? *Human Reproduction* 1999;14: 1669-1671

Hendry W.F., Stedronska J., Hughes L., Cameron K.M., Pugh R.C.B.: Steroid treatment of male subfertility caused by antisperm antibodies. *Lancet* 1979;2: 498-501

Henkel R.: Ejakulat (in: Krause W., Weidner W.: *Andrologie - Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*, 3. Auflage, Enke-Verlag 1998: Kap. 1.8)

Hjort T., Ahuja S.P., Poulsen F.: Studies on sperm membrane antigens. *Academic press* 1982;45: 77-90

Jager S., Kremer J., Kuiken J., van Slochteren-Draaisma T., Mulder I., De Wilde-Janssen I.W.: Induction of the shaking phenomenon by pretreatment of spermatozoa with sera containing anstispermatozoal antibodies. *Fertil Steril* 1981;36: 784-803

Jager S., Kremer J., De Wilde-Janssen I.W.: Are sperm immobilizing antibodies in cervical mucus an explanation for a poor postcoital test? *Am J Reprod Immunol* 1984;5: 56-60

Jairaj S., Check J.H., Bollendorf A.: Do antisperm antibodies cause functional impairment of the sperm membrane as manifested by a low hypoosmotic swelling test score? *Arch Androl* 2000;44: 231-235

Jarow J.F., Goluboff E.T., Chang T.S., Marshall, F.F.: Relationship between antispermatic antibodies and testicular histologic changes in humans after vasectomy. *Urology* 1994;43: 521-524

Jeulin C., Soumah A., Da Silva G., De Almeida M.: In-vitro processing of sperm with autoantibodies: analysis of sperm population *Hum Reprod* 1989;4: 44-48

Jeyendran R.S., van der Ven H.H., Peres-Pelacz M.: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984;70: 219-228

Jones W.R.: Immunologic infertility – fact or fiction? *Fertil Steril* 1980;33: 577-586

Kay D.J., Boettcher B.: Common specificities of auto- and iso-antibodies to human spermatozoa. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1985;8: 10-14

Koehler J.K. et al.: Fine structures observations on the distribution of antigenic sites on guinea pig spermatozoa. *J Cell Biol* 1974;60: 789-795

Krause W., Weidner W. (Hrsg.): *Andrologie - Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*, 3. Auflage, Enke-Verlag 1998

Kremer J., Jager S.: The significance of antisperm antibodies for sperm-cervical mucus interaction. *Hum Reprod* 1992;7: 781-784

Kruger T.F., Acosta A.A., Simmons K.F., Swanson R.J., Matta J.F, Oehninger S.: Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988;49: 112-116.

Lansford B., Haas G.G., Debault L.E., Wolf D.P.: Effect of sperm associated antibodies on the acrosomal status of human sperm. *J Androl* 1990;11: 532-538

Lahteenmaki A., Reima I., Hovatta O.: Treatment of severe male immunological infertility by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995;10: 2824-2828

Lee C.Y.G., Lum V., Wong E., Menge A.C.: Identification of human sperm antigens to antisperm antibodies. *Am J Reprod Immunol* 1983;3: 183-187

Lehmann D., Temminck B., Da Rugna D., Leibundgut B., Müller H.: Blot-immunobinding test for the detection of antisperm-antibodies. *J Reprod Immunol* 1985;8: 329-336

London SN, Hanney AF, Weinberg JB: Macrophages and Infertility: enhancement of human macrophage-mediated sperm killing by antisperm antibodies. Presented at the Thirteenth Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation, March 17 to 20, 1983, Washington D.C.

Mardesic T., Ulcova-Gallova Z., Huttelova R., Muller P., Voboril J., Mikova M., Hulvert J.: *Am J Reprod Immunol* 2000;43: 1-5

Marshburn P.B., Kutteh W.H.: The role of antisperm antibodies in infertility. *Fertil Steril* 1994;61: 799-811

Mazumdar S., Levine M.D.: Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Fertil Steril* 1998;70: 799-810

Meinertz H., Linnet L., Fogh-Anderson P., Hjort T.: Antisperm antibodies and fertility after vasovasostomy: a follow-up study of 216 men. *Fertil Steril* 1990;54: 315-321

Menge A.C., Schoultz G.K., Kelsey D.E., Rutherford P.: Characterization of monoclonal antibodies against human sperm antigens by immunoassays including sperm function assays and epitope evaluation. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987;13: 108-114

Menge A.C., Breitner O.: Interrelationship among semen characteristics, antisperm antibodies, and cervical mucus penetration assays in infertile human couples. *Fertil Steril* 1989;5: 486-492

Metalnikoff S.: Etudes sur las spermatoxine. *Ann Inst Pasteur* 1900;14: 577-589

Milette C.: Cell surface antigens during mammalian spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol* 1979;13: 1-29

Miller D.J., Macek M.B., Shur B.D.: Complementarity between sperm surface β -1,4-galactosyl-transferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* 1992;357: 589-593

Naaby-Hansen S., Bjerrum O.J.: Auto- and iso-antigens of human spermatozoa detected by immunoblotting of human sera after SDS-PAGE. *J Reprod Immunol* 1985;7: 41-57

Nagy Z.P., Verheyen G., Liu J., Joris H., Janssenwillen C., Wissanto A., Devroey P., Van Steirteghem A.C.: Results of 55 intracytoplasmic sperm injection cycles in the treatment of male-immunological infertility. *Hum Reprod* 1995;10: 1775-1780

Nardone P. et al: Cytochemical characterization and localization of oligoamminosidic oligosaccharide receptors on the normal human spermatozoa using

fluorescent lectins: comparison of different fixation methods. Am J Reprod Immunol Microbiol; 1985;9: 124-128

Nieschlag E., Behre H.M.: Andrologie - Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes, 1. Auflage, Springer-Verlag 1996

Ochsendorf F., Beschmann H.A.: Männliche Infertilität, 1. Auflage, Springer-Verlag 1996

Poulsen F.: An improved method for isolation of tritium-labelled autogen-1 of the human sperm membrane. J Clin Lab Immunol 1983;10: 59-62

Price R.J., Boetcher B.: The presence of complement in human cervical mucus and its possible relevance to infertility in women with complement-dependent sperm immobilizing antibodies. Fertil Steril 1979;32: 61-65

Psychrembel, Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage

Roche Lexikon Medizin, 4. Auflage

Rumke P.H.: The presence of sperm antibodies in the serum of two patients with oligozoospermia. Vox sanguinis 1954;4: 135-140

Rumke P., Hellinga G.: Autoantibodies against spermatozoa in sterile men. Am J Clin Pathol 1959;32: 357-363

Saji F., Ohashi K., Kamiura S., Negero T., Tanizawa O.: Identification and characterization of a human sperm antigen corresponding to human sperm immobilizing antibodies. Am J Reprod Immunol Microbiol 1988;17: 128-133

Schill W.B., Köhn F.M.: Andrologie (in: Fritsch P.: Dermatologie und Venerologie, Springer-Verlag 1998, Kap.24)

Schmidt L., Münster K.: Infertility, involuntary infecundity, and the seeking of medical advice in industrial countries 1970-1992; a review of concepts, measurements and results. *Human Reprod.* 1995;10: 1407-1418

Schumacher G.F.B.: Immunology of spermatozoa and cervical mucus. *Human Reprod.* 1988;3: 3-7

Schumacher G.F.B.: Antikörper gegen Spermatozoen: Relative oder absolute Ursache von Sterilität? *Gyne* 1989;3: 77-81

Schwarzinger F., Schüller Th., Krause W.: Flow cytometric determination of binding of monoclonal antibodies to human spermatozoa. *Andrologia* 1997;29: 163-168

Shigeta M., Watanabe T., Maruyama S., Koyama K., Isojima S.: Sperm-immobilizing monoclonal antibody to human seminal plasma antigens. *Clin Exp Immunol* 1980; 42: 458-62

Sinton E.B., Riemann, D.C., Ashton M.: Antisperm Antibody Detection Using Concurrent Cytofluorometry and Indirect Immunofluorescence Microscopy. *Am J Clin Pathol* 1991;95: 242-246

Smarr S.C., Wing R., Hammond M.G.: Effect of therapy on infertile couples with antisperm antibodies. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158: 969-973

Smith R., Madariaga M., Bustos-Obregon E.: Reappraisal of the hypo-osmotic swelling test to improve assessment of semen fertility status. *Int J Androl* 1992;15: 5-13

Snow K., Ball G.D.: Characterization of human sperm antigens and antisperm antibodies in infertile patients. *Fertil Steril* 1992;58: 1011-1019

Tasdemir I., Tasdemir M., Fukuda J., Kodama H., Matsui T., Tanaka T.: Effect of sperm-immobilizing antibodies on the spontaneous and calcium-ionophore (A23187) induced acrosome reaction. *Int J Fertil* 1995;40: 192-195

Taylor P.J., Collins J.A.: *Unexplained infertility*. Oxford University Press 1992, Oxford, UK, 128-131

Ünlü C., Böhmer S., Maas D.H.A.: Immunologische Faktoren bei extrakorporaler Befruchtung. *Fortschr Med* 1990;108: S.450-453

Van den Saffele J., Vermeulen L., Schoonjans F., Comhaire F.: Evaluation of the hypo-osmotic swelling test in relation with advanced methods of semen analysis. *Andrologia* 1992;24: 213-217

Verheyen G., Tournaye H., Laurier K., Devroey P., Van Steierteghem A.: Autocontrolled study on in vitro fertilization performance with antibody-free spermatozoa selected by immunobeadabsorption from semen of patients with antisperm antibodies. *Hum Reprod* 1994;9: 1119-1126

Wessendorf M.W., Brejle T.C.: Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamin, lissamine rhodamine, Texas Red, and cyanine 3.18. *Histochemistry* 1992;98: 81-85

WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates. 3.Auflage, Springer Berlin-Heidelberg 1993

Wilson L.: Sperm agglutinins in human semen and blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954;85: 652-655

Witkin S.S., Zelikovsky G., Good R.A., Day N.K.: Demonstration of 11s IgA antibody to spermatozoa in human seminal fluid. *Clin Exp Immunol* 1981;44: 368-374

Wolf J.P., Roudriges T.L., De Almeida M., Jouannet P., Ducot B.: High levels of sperm-associated antibodies impair human sperm-oolemma interaction after subzonal insemination. *Fertil Steril* 1995;63: 584-590

Young L.G., Smithwick E.B.: Binding of Sperm-Reactive Antibodies in Human Sera to Surface-Associated Antigens on Human Sperm Compared by Indirect Immunobead, Immunofluorescence, and Immunogold-Assay. *Am J Reprod Immunol* 1991;25: 41-47

Ziegler A., Hirsch T., Krause W., Neumann K., Schieferstein G., Dohr G., Kohlstadt S., Uchanska-Ziegler B.: Monoclonal antibodies against antigens expressed by human spermatozoa. *Andrologia* 1990;22: 101-110

Zouari R., De Almeida M.: Effect of sperm-associated antibodies on human sperm-ability to bind to zona pellucida and to penetrate zona-free hamster oocytes. *J Reprod Immunol* 1993;24: 175-186

Lebenslauf:

5. November 1973	Geburt in Aachen als zweites Kind der Eheleute Dr. med. Brigitte Klepper, geb. Stuckenbrock, und Dr. med. Karl-Ernst Klepper
August 1980 - Juni 1984	Grundschule „Görresschule“, Neuss
August 1984 - Juni 1993	Quirinus-Gymnasium, Neuss
November 1993	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Technischen Universität Dresden
März 1997	Ärztliche Vorprüfung
April 1997	Wechsel an die Philipps-Universität Marburg
Oktober 1997	Beginn der vorliegenden Dissertation
März 1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Februar - Juni 1999	Gastsemester an der Universität Wien
März 2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2000	Beginn des Praktischen Jahres an den Universitätskliniken Marburg (Wahltertial: Dermatologie)
November 2000 - März 2001	Tertial Chirurgie an der Klinik Hirslanden, Zürich
Juni 2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit Juli 2001-	Arzt im Praktikum am Städtischen Krankenhaus Hildesheim, Hautklinik

Verzeichnis der akademischen Lehrer:

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Dresden:

Bartsch, Blochwitz, Czubayko, Dahlitz, Ficker, Funk, Hermann, Krieg, Krinke, Moerchel, Nicklisch, Nimtscke, Oehler, Pätzold, Schäfer, Schwab, Seitz, Wenzel,

die Damen und Herren in Marburg:

Arnold, Barth, Brandenburg, Chubayko, Eissele, Gerdes, Göke, Gotzen, Happle, Heeg, Hesse, Hofmann, Joseph, Klenk, Köhler, Klose, Krause, Kretschmer, Krieg, Lange, Lennartz, Maisch, Moll, Moosdorf, Peter, Renz, Richter, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schreiber, Seyberth, Thomas, Vohland, Werner, von Wichert, ,

die Damen und Herren in Wien:

Bauer, Deeche, Ehrenberger, Freyler, Hüsslein, Kasper, Kotz, Kunze, Maier, Tönnies, Urbanek, Wolff,

sowie die Herren in Zürich:

Baer, Jensen.